

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA –
PIBIC

**CINÉTICA DA PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS NO
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM
CAMUNDONGOS**

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica PIBIC/FAPITEC

Área de Concentração: Imunologia

Relatório Final

2016/2017

ANANDA RESENDE DA MATA

**CINÉTICA DA PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS NO
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM
CAMUNDONGOS**

Relatório final do PIBIC apresentado a
Pró-reitoria de Pós-graduação e pesquisa
da Universidade Federal de Sergipe.

Orientador/Coordenador: Dr. Carlos Eduardo Palanch Repeke

LAGARTO-SE

2016/2017

RESUMO

O processo de reparo ósseo é uma reação tecidual dinâmica, que apresenta diferentes etapas, tais como: inflamação, proliferação celular e a síntese de elementos da matriz extracelular. Dentre as possíveis estratégias para otimização terapêutica do reparo ósseo alveolar, podemos destacar a modulação na presença e formação de vasos sanguíneos, que se mostra extremamente importante ao processo de reparo ósseo, cujas cinética ainda não são profundamente compreendidas. O presente estudo tem como objetivo analisar a cinética da presença de vasos sanguíneos e correlacionar com a presença de coágulo e matriz óssea e a sua importância no processo de reparo ósseo alveolar. A pesquisa partirá da confecção e análise histológica das lâminas com intuito de verificar diferentes células, estruturas e tecidos histológicos. Como resultado obtivemos formação de coágulo no período de 0 hora, presença de neovascularização no 7º dia, houve um preenchimento ósseo parcial da porção central do alvéolo no período de 14 dias e por fim aos 21 dias ocorreu o reparo do alvéolo dental. Desta forma, a pesquisa verificou uma ligação direta entre os fenômenos angiogênicos na resposta imune e quimiotática em uma condição de reparo de tecido ósseo.

Palavras chaves: Angiogênese; Reparo ósseo; Alvéolo Dental; Camundongos.

Sumário

Revisão de literatura	8
Processo de reparo alveolar	8
Fase inflamatória	8
Fase proliferativa	9
Papel do VEGF-A, FGF-2, CTGF, CYR61, Angiopoetinas, CXCL1, CXCL10 na angiogênese	10
Fibroplasia	11
Fatores de crescimento envolvidos na deposição de MEC e formação da cicatriz	11
Epitelização	11
Fase de Maturação	11
Tecido ósseo	12
Metodologia	13
Resultados	16
Análise histológica descritiva do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos	16
Análise histomorfométrica comparativa do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos	18
Discussão	20
Considerações finais	23
Referências bibliográficas	24

Introdução

Após lesões ou perda de tecido ósseo, o adequado desenvolvimento do processo de reparo e neoformação óssea são fundamentais para o restabelecimento da homeostasia tecidual e recuperação de suas funções, ou para possibilitar terapias reabilitadoras. Nesse contexto, diversas frentes de estudos têm tentado potencializar o processo de formação e reparo ósseo, envolvendo desde estudos com variados biomateriais até estudos focados na interação entre células ósseas e mediadores envolvidos na reposta inflamatória e imunológica (BIRN, 1973). Embora o balanço entre a formação óssea e a resposta inflamatória mostre-se extremamente importante, tal interação permanece pouco compreendida.

Enquanto uma resposta imune e inflamatória exacerbada caracteristicamente está associada à reabsorção óssea, estudos demonstram que a inibição da resposta imune/inflamatória com anti-inflamatórios, influenciam de forma negativa os processos de reparo ósseo e osseointegração (JACOBSSON, SA et al., 1994.; KALYVAS, DG 2008). A grande maioria dos estudos disponíveis na literatura têm se concentrado na influência de células e mediadores imunológicos na ativação de osteoclastos e no processo de reabsorção óssea, entretanto, não se sabe exatamente quando é realmente necessária a modulação da resposta imune e inflamatória, uma vez que dependendo do tipo e intensidade da resposta seu impacto no tecido ósseo pode variar significativamente.

Buscando modular a presença das células ósseas em situações de resposta imune e inflamatória, inicialmente é importante compreendermos como ocorre a interação entre o sistema ósseo, o sistema imune e o sistema vascular. O tecido ósseo é um tecido mineralizado e extremamente dinâmico e vascularizado, que mesmo em homeostase, apresenta alta taxa de renovação. Basicamente esse tecido é formado por três tipos celulares, os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, que em conjunto são responsáveis pela sua constante remodelação deste tecido, em ciclos de reabsorção e deposição óssea, um processo chamado de *"couple bone formation"* (TAKAYANAGI, H. 2003).

Uma vez que o osteoblasto e o osteoclasto atuem de forma direta na formação e reabsorção óssea, a presença de vasos sanguíneos demonstra um papel fundamental na migração das células progenitoras do tecido ósseo (TAZIMA *et al.* 2008). Quando um tecido novo é formado, no caso o tecido ósseo, é vital o fluxo sanguíneo para seu crescimento e subsistência. Para que ocorra a migração das células endoteliais e o desenvolvimento de novos capilares de estrutura tubular há dependência não só das células e citocinas presentes, mas também de uma produção e organização dos componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, vitronectina, tenascina e laminina, tanto no tecido de granulação quanto na membrana endotelial basal (LEFKOVITS *et al.* 1995.; WAGNER *et al.* 1996).

A matriz extracelular é importante para o crescimento e manutenção normal dos vasos, pois, além de agir como “plataforma” que dá suporte à migração celular, age também como reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento. A proliferação das células endoteliais adjacentes e dentro da ferida leva à deposição, de forma transitória, de grandes quantidades de fibronectina na parede do vaso. Assim, a angiogênese requer a expressão de receptores para fibronectina pelas células endoteliais, organizando a fibronectina como um canal, de modo a permitir o movimento das células endoteliais (WU *et al.*, 2013). No entanto, no caso específico do reparo ósseo alveolar em que a neoformação óssea não é precedida pela formação de um tecido cartilaginoso, o estímulo para desencadear a angiogênese ainda não está completamente estabelecido.

Desta forma, torna-se importante o conhecimento aprofundado do fenômeno angiogênico e sua importância na modulação da resposta imune em condição de reparo do tecido ósseo. O presente estudo tem como objetivo analisar a cinética dos vasos sanguíneos, coágulo e matriz óssea, bem como a influência da angiogênese no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos.

Revisão de literatura

Os primeiros relatos realizados sobre o processo de reparo alveolar foram feitos por meio de descrições radiográficas e histológicas, utilizando alvéolos de cães. O processo de reparo alveolar é um conjunto de reações teciduais ocorridas no interior do alvéolo após a exodontia, com o objetivo de preencher o alvéolo com tecido neoformado (EULER, 1923.; CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

Com o advento do processo de reparo alveolar, estudos buscam identificar cronologicamente as reações teciduais em animais de laboratório. Entretanto, o cão, o macaco e o rato são os mais pesquisados. Apesar da variação cronológica no processo de reparo alveolar entre animais e homens, os eventos são semelhantes, sendo plausível definir as principais características comuns da histogênese do reparo (AMLER, 1969.; HUEBSCH *et al.* 1952, SIMPSON, 1969).

No processo de cicatrização ocorre uma coordenada cascata de eventos moleculares, celulares e bioquímicos que interagem entre si para que ocorra o reparo tecidual. Carrel em 1910 apresentou os mecanismos da cicatrização em ordem de eventos os quais foram divididos posteriormente em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida (Orgill&Demling, 1988; Carrel, 1910). Recentemente, Clark apresentou esse processo em três fases divididas, didaticamente, em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelamento ou de maturação (CLARK, 2005)

Processo de reparo alveolar

Fase inflamatória

Após a lesão os eventos iniciais do reparo estão voltados ao tamponamento dos vasos, ocorrendo à liberação de tromboxana A2 e prostaglandinas pelas membranas celulares, permitindo que ocorra uma vasoconstricção. Com a injúria ao tecido ocorre uma deposição de plaquetas resultando em um trombo, a adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Esse receptor possui sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand,

vitronectina, fibronectina e trombospondina (LEFKOVITS *et al.* 1995.; WAGNER *et al.* 1996). Visando a hemostasia e iniciando a cascata de eventos com ativação das plaquetas e liberação de grânulos e fatores de crescimento que favorecem a agregação plaquetária. Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como: TGF- β , PDGF (DYSON, 1990), tromboxanos e PAF promovem um gradiente quimiotático e contribuem para a reposta inflamatória visando uma vasodilatação que permitirá maior permeabilidade vascular, com influxo de neutrófilos.

As primeiras células a chegarem à ferida são os neutrófilos, em uma concentração maior por volta de 24 horas após a lesão, eles aderem à parede do endotélio por meio das selectinas e paulatinamente são substituídos por macrófagos, esse desempenham função importante, como; secreção de citocinas, fatores de crescimento e colabora para o processo angiogênico, fibroplasia e síntese da matriz extracelular, tendo grande influência na transição para fase proliferativa (BROUGHTON ET AL, 2006).

Fase proliferativa

Após as 24 horas ocorrem à organização do colágeno sanguíneo, com invasão de fibroblastos originando-se o processo de fibroplasia, com formação do tecido de granulação o qual preencherá todo o alvéolo e que está suportado por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e II (JOHANSEN, 1970; LIN; MCCULLOCH; CHO, 1994; SIMPSON, 1969; GUIDUGLI-NETO, 1992). Ao mesmo tempo, ocorre a proliferação de células endoteliais, originando novos vasos sanguíneos, que é de essencial importância, pois permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY, DUDLEY, 1988). A fase proliferativa é subdivida em três eventos: neo-angiogênese, fibroplasia, e epitelização (TAZIMA *et al.* 2008).

Neo- angiogênese: é o processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, seguindo algumas sequencias como: vasodilatação em resposta ao NO e aumento da permeabilidade induzida pelo VEGF, separação dos pericitos da superfície abluminal, com migração de células endoteliais para área lesada, conformação em tubos

capilares, recrutamento de células periendothelias para formação de um vaso maduro e supressão da proliferação e migração endotelial e deposição de membrana basal (KUMAR, V. et al. 2013).

Papel do VEGF-A, FGF-2, CTGF, CYR61, Angiopoetinas, GRO- α , IP-10 na angiogênese

A família do VEGF inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFE e o PLGF. O VEGF-A foi identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento (GALE, YANCOPOULOS, 1999). Ele promove vasodilatação por estímulo da produção de NO e contribui para formação do lúmen vascular. O VEGF além de induzir a mitose das células endoteliais pode atuar inibindo apoptose das mesmas, o VEGF aumenta a quantidade de MMP, degradando a matriz extracelular possibilitando maior facilidade de penetração de vasos neoformados, possuindo também efeito pró-inflamatório, neuroprotetor e atua na estabilização e remodelação vascular (CULLINAN-BOVE, KOOS, 1993; CONTRAN, 1996; BROWN, 1997; FERRARA, 2000).

O FGF-2 atua na angiogênese estimulando a proliferação de células endoteliais e propicia a migração de macrófagos e fibroblastos para área lesada (RISAU, 1990).

As *angiopoetinas Ang1 e Ang2* são fatores de crescimento que atuam na angiogênese e na maturação estrutural de novos vasos sanguíneos por meio da interação com receptores Tie2 (KUMAR, V. et al. 2013).

Recentemente foi identificado que CTGF juntamente com a CYR61 promovem, *in vitro*, a migração e sobrevivência de células endoteliais e *in vivo* desencadeia a angiogênese (BABIC *et al.* 1999; HUTSON *et al.* 1979; BABIC *et al.* 1998).

As quimiocinas CXCL1, CXCL10 demonstram influência sob o processo angiogênico, sendo que a primeira atua por meio de ação indutora já a segunda inibidora respectivamente. A CXCL1 está presente no início da inflamação tem função de quimiotaxia e exerce um papel especial na migração de queratinócitos. Já o CXCL10 está presente nos casos de inflamação crônica (ENGELHARDT *et al.* 1998).

Fibroplasia

Os fibroblastos só aparecem no local da lesão a partir do terceiro dia, depois que as células polimorfonucleares já fizeram a limpeza da área, esses são oriundos de células mesenquimais, e tem como função a deposição de MEC e sintetizar colágeno. A produção de colágeno depende da oxigenação das células, hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada pelo próprio fibroblasto em presença de co-enzimas: vitaminas A, C e E, ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco. Em meados a quarta semana ocorre um equilíbrio e maturação do colágeno (TAZIMA, 2008).

Fatores de crescimento envolvidos na deposição de MEC e formação da cicatriz

Os TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, são mitogênicos para fibroblastos e estimula a produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, e inibe a degradação do colágeno com a diminuição da proteinase aumento dos TIMPs. O TGF- β é uma citocina que atua como limitadora para resposta final da inflamação.(KUMAR, V. et al. 2013).

O PDGF contribui na estimulação de fibroblastos para a produção de matriz extracelular, estimula a sua proliferação e induz nestas células a sua mudança de fenótipo para miofibroblastos (CHOI *et al.* 1996.; CLARK, 1993.; HELDIN, WESTERMARK, 1999).

Epitelização

Nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão, fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio. Na pele os ceratinócitos são capazes de sintetizar diversas citocinas que estimulam a cicatrização das feridas cutâneas (TAZIMA, 2008).

Fase de Maturação

Por volta da 3ª semana ocorre a maturação da ferida que caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno. Há um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da collagenase (TAZIMA, 2008).

Após três meses a força tênsil é recuperada em 80% e, mesmo após um ano a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã,

e a força tênsil jamais retornará a 100% (BROUGHTON *et al*, 2006; CAMPOS *et al*. 2007).

Tecido ósseo

Os osteoblastos são as células produtoras de matéria orgânica do osso. O osso alveolar consiste em uma matriz calcificada com osteócitos aprisionados em lacunas. Os prolongamentos dos osteócitos ficam nos canalículos. Os canalículos formam um sistema de anastomoses, trazendo oxigênio e nutrientes para os osteócitos através do sangue e removendo os produtos residuais do metabolismo. Os sistemas haversianos são o mecanismo interno que traz suprimento vascular para os ossos mais espessos para receber suprimento apenas por vasos da superfície. Os compostos inorgânicos consistem em cálcio e fosfato, carbonatos, citratos e hidroxilas. Os sais minerais aparecem sob a forma de cristais de hidroxiapatita. A matriz orgânica é formada principalmente por colágeno tipo I (90%). O osso é a principal fonte de cálcio do organismo, quando seus níveis no sangue diminuem (Carranza, *et al.*, 2012).

A partir do quarto dia, os osteoblastos formados a partir de células osteoprogenitoras, depositam matriz extracelular, formando um tecido osteóide. Tanto a formação do tecido de granulação quanto formação de tecido osteóide utilizam restos epiteliais de Malassez (CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

A atividade osteogênica resulta em um tecido rico em células osteoblasticas. O tecido ósseo neoformado apresenta uma estrutura trabecular irregular com fibras de colágeno desorganizadas e uma alta concentração de osteoblastos e osteócitos e menor grau de mineralização. No processo de osteogênese ocorre uma proliferação de osteoblasto na região central do alvéolo, à medida que esse processo progride o osso imaturo é substituído por osso lamelar “maduro” (OKAMOTO, 1987). Aos 21 dias, verificou que o tecido ósseo preenchia todo o alvéolo e o periósteo retornara à sua forma normal (SMITH, 1974).

O reparo será considerado completo quando o alvéolo estiver completamente preenchido por tecido ósseo neoformado e quando a crista alveolar estiver remodelada, e apresente um equilíbrio nas atividades osteoclástico-osteoblástico e quando o novo osso estiver em condições para

suportar novos estímulos, isso se dá em médio por volta do sétimo mês “210 dias” (RUSSO,1973.; CARVALHO, OKAMOTO, 1987).

A fosfatase alcalina é uma enzima predominantemente encontrada na circulação, são a óssea, hepática e intestinal. Essa enzima está localizada na superfície externa da célula e são liberadas na circulação por meio da ação das fosfolipases C e D, sendo utilizada como marcador bioquímico de formação no metabolismo ósseo (CARDOSO, 2009; VIEIRA, 1999).

A osteocalcina é uma proteína que apresenta produção aumentada durante o período de mineralização, sendo um indicativo para formação óssea, presentes em maiores quantidades, no período de 6 a 8 semanas (TROMBELLI, L. et al. 2008).

O processo de reparo ósseo é influenciado por vários fatores, sendo esses sistêmicos (falta de vitamina), condições metabólicas, circulatórias, hormonais e fatores locais como: trauma, tipo da ferida, resposta inflamatória e infecção (BIRN, 1973).

Metodologia

O estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo, e encontra-se protocolado sob o N.º 007/2014

Animais de experimentação. Foram utilizados 20 camundongos do tipo selvagem (C57Bl/6-WT) com idade aproximada de 8 semanas, cedidos pelo biotério da Universidade de São Paulo (USP). Somente camundongos machos foram utilizados para evitar a influência hormonal no processo de reparo alveolar. Os animais serão alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) e água *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, em que essa alimentação será triturada. Os 20 animais serão analisados de acordo com os diferentes períodos pós exodontia (0 hora, 7, 14 e 21 dias). ***O número de animais, os tempos de análises e as atividades propostas, foram determinados de acordo com estudos prévios e experimentos piloto.***

Procedimentos Histotécnicos. Esta pesquisa partirá da confecção histológica das lâminas e análise das diferentes células, estruturas e tecidos histológicos, além de conhecer o processo de *reparo* ósseo alveolar. Os camundongos já passaram pelos procedimentos cirúrgicos com a exodontia do incisivo superior direito e as amostras contendo os alvéolos foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas (pH 7,2), com acondicionamento em fixador alcóolico e escaneamento em *MicroCT*, as amostras serão lavadas em água corrente (“over-night”) e desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) à temperatura ambiente, por um período aproximado de quarenta dias, respeitando as trocas semanais da solução desmineralizadora e monitoramento por meio da análise radiográfica. Posteriormente, as amostras serão lavadas em água corrente por 24 horas visando à total remoção de EDTA, e em seguida submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Para inclusão, procederá a desidratação das amostras em 3 banhos de soluções de etanol 100% (dois banhos por 4 horas, seguido de um banho de 12 horas). Em seguida as amostras desidratadas passarão por 3 banhos de 1 hora em soluções de xilol, e por fim serão incluídas em parafina para confecção dos blocos. Os blocos de parafina serão submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal (perpendicular ao longo eixo do alvéolo dental), utilizando-se um micrótomo Leica Jung RM 2045. Todo o processo histológico foi realizado no laboratório de Histologia da Universidade Federal do Segipe (UFS).

Procedimentos histológicos, análise morfológica e histomorfométrica. Para as análises histológicas descritiva (qualitativa) e histomorfométrica (quantitativa), foram obtidas 6 lâminas de cada animal, com 8 cortes semi-seriados em cada lâmina, os quais foram corados em HE para serem observados e analisados em microscópio óptico. As análises histológicas descritivas foram realizadas com emprego de um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), sendo considerado o terço apical, médio e superficial do alvéolo dental dos diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para todos os grupos. Optou-se por uma descrição

histológica qualitativa mais abrangente da evolução do processo de reparo alveolar em objetivas menores (4x e 10x), e uma análise descritiva mais detalhada em objetiva de aumento de 40x, acompanhando os eventos de reparação óssea conforme os seguintes eventos: Presença e reabsorção gradativa do coágulo sanguíneo; Presença de infiltrado inflamatório; Formação de tecido de granulação e sua transição para tecido conjuntivo, e deste para tecido ósseo neoformado; Processo de remodelação das trabéculas ósseas neoformadas (evidenciado pela presença de osteoclastos); Trabéculas ósseas já remodeladas, evidenciadas por linhas de reversão; Maturação do tecido ósseo neoformado, sugerida pela presença de tecido medular. A análise histomorfométrica foi realizada por meio da avaliação da densidade de área das estruturas constituintes do tecido alveolar durante o reparo, sendo considerados os vasos sanguíneos, coágulo e osso. A densidade da área foi obtida por meio de contagem de pontos coincidentes sobre os critérios histológicos supracitados, com o emprego de uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x (Carl-Zeiss Micro Imaging Inc.), contendo uma grade ou retículo de integração II ZEISS e uma objetiva de imersão com o aumento de 100x, em microscópio óptico binocular (JENAMED 2 (Carl-Zeiss)). O retículo de integração utilizado constitui uma grade composta por um quadrado que limita a área a ser estudada, e que contém um conjunto de 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos (Figura 1a). Assim, a sobreposição do retículo sobre o campo histológico permitirá a contagem de estruturas que fossem coincidentes com os pontos do retículo, sendo considerados ao todo 13 campos microscópicos distintos, dispostos regular e sistematicamente sobre um único corte histológico. Para cada animal, serão considerados pelo menos 3 cortes histológicos abrangendo o terço médio do alvéolo, sendo portanto contados ao todo 39 campos, conforme demonstrado na (Figura 1b). Os campos serão escolhidos com intervalos regulares em cada corte, de maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte (WEIBEL, 1969). O cálculo da densidade de área (D_a) será obtido pela contagem de pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas (P_i) e o número total de pontos existentes no retículo (P), sendo adotada a seguinte regra ($D_a = 100 \times [\sum P_i / \sum P]$). O total de pontos ocupados pelo alvéolo será considerado 100%, sendo P_i estabelecido

como percentual relativo a este, ocupado por cada uma das estruturas consideradas com os valores resultantes da contagem dos 3 cortes histológicos de cada animal. Posteriormente serão calculadas a média e o desvio padrão dos percentuais obtidos nos animais pertencentes ao mesmo grupo.

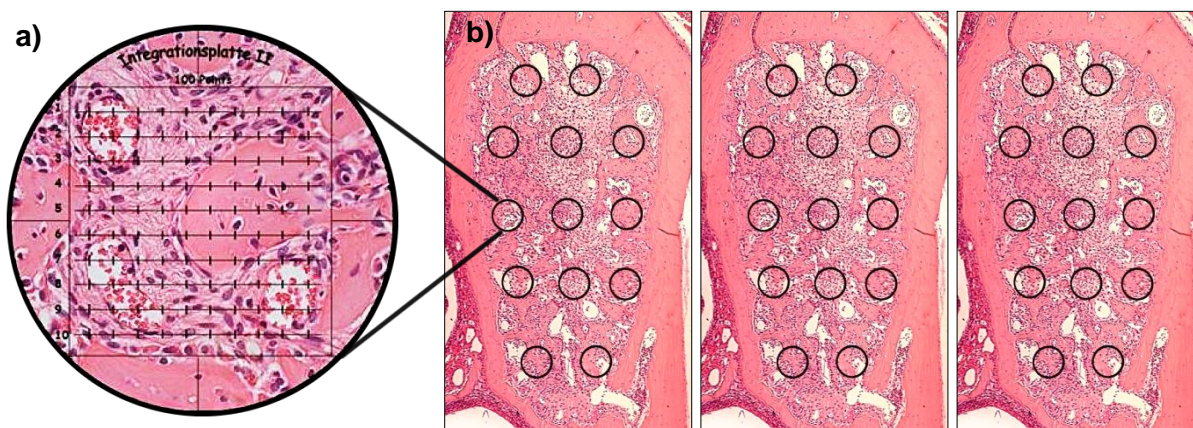


Figura 1: Representação esquemática da análise histomorfométrica. Em **(a)** retículo de integração (II ZEISS) sobreposto a um corte histológico formando um campo contendo 100 pontos equidistantes (10x10) e sua distribuição regular por 13 campos sobre o corte histológico em **(b)**, totalizando 39 campos nos 3 cortes histológicos do terço médio do alvéolo pós-exodontia.

Resultados

Análise histológica descritiva do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos

0 hora pós-operatório

Os alvéolos dentais dos animais estavam preenchidos predominantemente por coágulo sanguíneo e alguns espaços vazios que caracterizavam um possível exsudato inflamatório e presença de alguns resquícios do ligamento periodontal.

7 dias pós-operatório

O alvéolo dentário encontra-se preenchido por tecido de granulação com pequenos vasos sanguíneos, fibroblastos e tecido conjuntivo desorganizado neoformado, com presença de pouco ou nenhum remanescente do coágulo

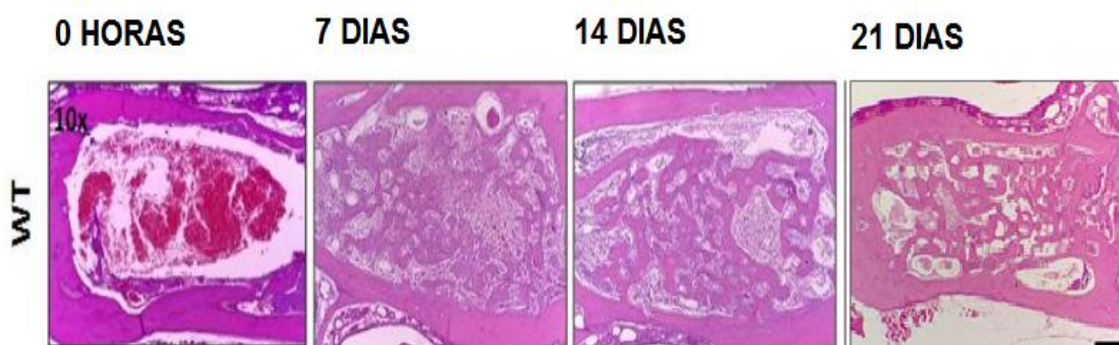
sanguíneo, com um aumento do infiltrado inflamatório com presença de células polimorfonucleares e mononucleares distinguíveis em HE. Em algumas regiões foram observadas discretas trabéculas ósseas imatura, ricas em osteoblastos e osteócitos.

14 dias pós-operatório

Observaram-se uma proliferação de fibroblastos com disposição organizada no tecido conjuntivo ao lado de alguns linfócitos e plasmócitos, nesse momento teve uma intensa propagação de vasos sanguíneos e em alguns pontos verificou-se reabsorção óssea com presença de osteoclastos. Neste período houve um preenchimento ósseo parcial da porção central do alvéolo, com presença de trabéculas ósseas finas revestidas por diversos osteoblastos.

21 dias pós-operatório

Notou-se a finalização do processo de reparo dos tecidos do alvéolo dental, com considerável regressão das áreas ocupadas por tecido conjuntivo, além da presença de tecido medular permeando o tecido ósseo neoformado. Células com morfologia aparente de células de revestimento e outras com morfologia sugestiva de osteoblastos ativos foram notadas alinhadas ao redor das trabéculas ósseas.



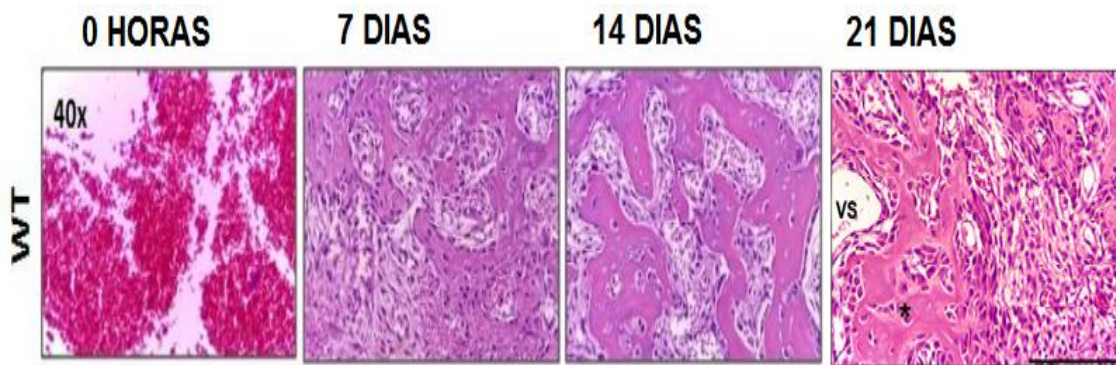


Figura 2: Fotomicrografia representativa do Grupo WT nos tempos de 0h, 7, 14 e 21 dias. Cortes histológicos foram obtidos provenientes dos alvéolos após exodontia do incisivo superior com a objetiva de 10x e 40x. (Coloração em H.E.; barra = 100 μ m).

Análise histomorfométrica comparativa do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos

Para a análise quantitativa, as estruturas descritas foram previamente categorizadas dentro de diferentes parâmetros histológicos, tais como: coágulo sanguíneo, vasos sanguíneos e matriz óssea. Dessa forma, cortes histológicos do terço médio do alvéolo dental dos camundongos foram corados em HE. Após, foram sistematicamente quantificados por meio de cálculo de densidade de área (%), permitindo assim uma análise comparativa dos eventos ocorridos durante os períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. Para organizar a disposição dos resultados de acordo com os tecidos observados na sequência do reparo, primeiro serão apresentados os resultados relativos ao coágulo sanguíneo, em seguida os resultados referentes aos parâmetros dos vasos sanguíneos e por fim, tecido ósseo.

Em relação à densidade de área de coágulo sanguíneo, houve uma intensa densidade de coágulo no período de 0 hora, com diminuição significativa no 7º dia pós-exodontia e entre os dias 14 e 21 observa-se a ausência do coágulo ($p < 0,05$; Figura 3).

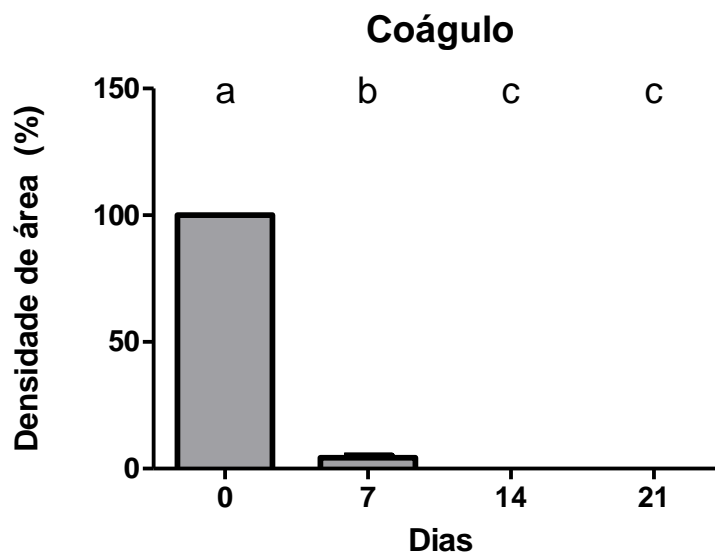


Figura 3: Análise quantitativa de densidade de área de coágulo presente no alvéolo dental do grupo WT em 0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupo ($p > 0,05$). One-way ANOVA com Tukey post-test.

Analisando-se o gráfico dos vasos sanguíneos, pode-se observar que no período de 0 hora, não ocorreu formação de vaso e entre os dias 7 e 14 houve uma crescente produção de vasos com um aumento de densidade e uma constante na quantidade de vasos neste intervalo de tempo, após 21 dias ocorreu um crescimento com maior densidade de volume dos vasos sanguíneos ($p < 0,05$; Figura 4).

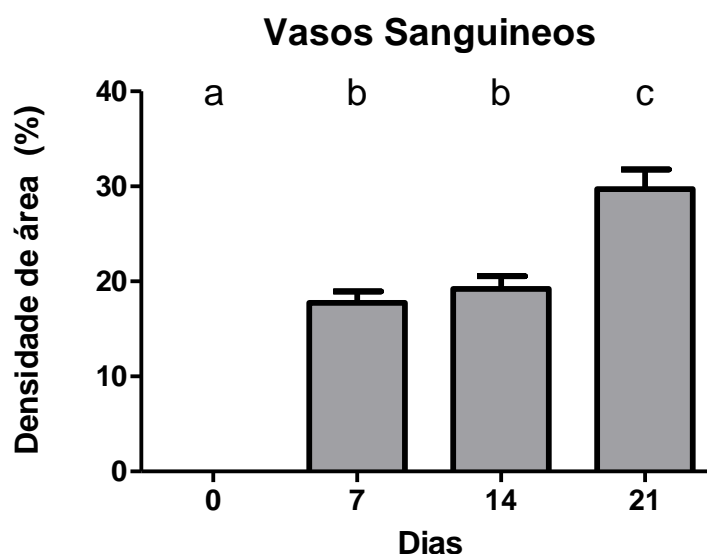


Figura 4: Análise quantitativa de densidade de área de vasos sanguíneos presente no alvéolo dental do grupo WT em 0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupo ($p>0,05$). One-way ANOVA com Tukey post-test.

Na análise individual da matriz óssea, os camundongos mostraram uma crescente produção de osso a partir do 7º dia e entre os dias 14 e 21 ocorreu um aumento de densidade em relação ao 7º dia e durante esse intervalo de tempo houve uma constante na densidade da matriz óssea ($p<0,05$: Figura 5).

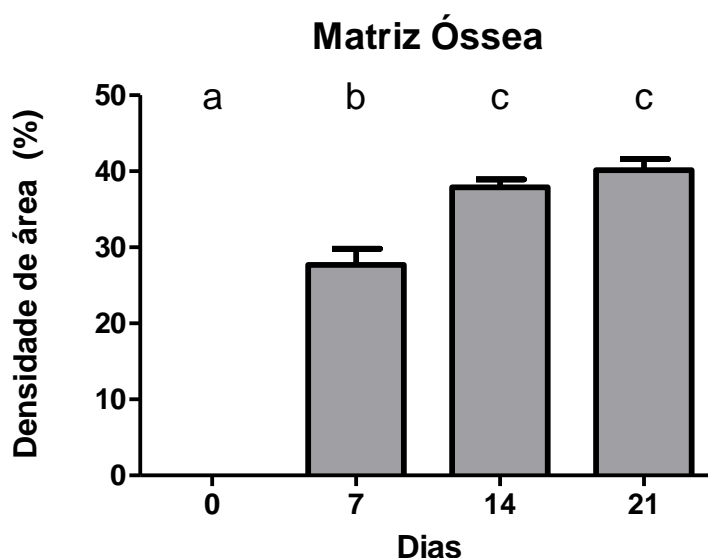


Figura 5: Análise quantitativa de densidade de área de matriz óssea presente no alvéolo dental do grupo WT em 0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupo ($p>0,05$). One-way ANOVA com Tukey post-test.

Discussão

A influência do processo angiogênico no reparo ósseo alveolar escolhido como modelo de estudo corroboram com outros trabalhos, demonstrando que o crescimento, a remodelação e o próprio reparo ósseo requerem uma interação coordenada entre o organismo. A escolha do camundongo como animal de experimentação é explicada em decorrência da maior facilidade de aquisição e

de alojamento bem como alta resistência a manipulação cirúrgica. Em relação as análises histológicas, o reparo ósseo alveolar em ratos é um excelente modelo de estudo pois exhibe a sequência evolutiva similar ao homem (EMERY; SANDERSON, 1995.; OKAMOTO; RUSSO, 1973). Quanto aos tempos experimentais, estes também foram definidos conforme padronização prévia em camundongos WT (C57Bl/6) (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013) considerando o tempo de 21 dias como um estágio de finalização do processo de reparo, em virtude da presença de tecido ósseo lamelar permeado por medula já nesta etapa, e pela maior quantidade de osso observada em relação aos tempos posteriores.

Conforme o resultado da análise histológica descritiva observou-se que após a exodontia, o alvéolo estava predominantemente preenchido por coágulo sanguíneo, resultante do rompimento dos vasos durante o procedimento de extração, além de favorecer o tamponamento dos vasos tal processo inicia uma série de eventos celulares e moleculares que resultam gradualmente no estabelecimento do tecido de granulação e do processo inflamatório, de modo que o coágulo organizado serve como um arcabouço provisório para invasão de células constitutivas, leucócitos e novos capilares sanguíneos, além de contribuir inicialmente para a liberação de diversos fatores de crescimento e citocinas, oriundos de plaquetas ativadas (BURNOUF et al., 2013).

Como demonstrado no dia 7 iniciou-se uma neovascularização que desempenha importante papel na maturação de células pela ação de fatores de crescimento via *feedback* entre as mesmas. Essa complexa via de comunicação é dependente de citocinas e fatores de crescimento que são os reguladores da angiogênese, sendo que o VEGF-A foi identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento (GALE, YANCOPOULOS, 1999). Esse é derivado do endotélio vascular e promove a vasodilação, induzindo a mitose de células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase, a ativação dos receptores TK é tipicamente iniciada pela ligação da molécula ativadora no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz uma dimerização dos receptores, resultando no processo de transdução do sinal, levando à proliferação e

ampliação dos vasos nos tecidos, diferenciação, migração, metabolismo e morte celular programada (MANASH, KP; MUKHOPADHYAY AK, 2004). A importância do VEGF na angiogênese foi evidenciada em estudos em camundongos, nos quais a deleção de ambos ou um único alelo do VEGF mostrou-se letal durante o desenvolvimento fetal devido à interrupção da angiogênese embrionária; sua expressão aumentada de maneira anormal também induz a morte fetal, devido à hiper-vascularização e por aumento da quantidade e do volume celular, proporcionando um aumento do tamanho dos tecidos (Hanahan, 1997; Stouffer e col., 2001). Além disso, o VEGF estimula a produção de MMP que permite uma degradação da matriz facilitando a penetração dos vasos neoformados. Comitadamente inicia-se a fase de neoformação óssea com discretas trabéculas ósseas imatura, ricas em osteoblastos e osteócitos. No décimo quarto dia pós-operatório houve uma pequena proliferação dos vasos sanguíneos e a atividade osteogênica resultará em um tecido denso e fibroso eosinófilico rico em osteoblastos com fibras colágenas organizadas, promovendo uma ossificação intramembranosa, que tem início no centro de ossificação primário onde ocorre a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, esses participam da calcificação da matriz, por meio da secreção de vesículas compostas por fosfatase alcalina para o interior desta, no período em que a célula produz a matriz óssea. A fosfatase alcalina atua clivando o pirofosfato e inibe sua influência estabilizadora e ao mesmo tempo aumenta o fosfato local para cristalização, além desse processo as vesículas de Cálcio contribuem para calcificação do osteoíde. Quando este se mineraliza, engloba osteoblasto que virarão osteócitos e formará um sistema de canalículos, adquirindo um aspecto esponjoso, e com a intensa atividade mitótica, cria-se um ambiente de células osteoprogenitoras, e com a remodelação o tecido será substituído por tecido ósseo maduro ou lamelar (JONHSON, 2000).

A análise dos dados demonstra que o processo de reparo ósseo é semelhante aos obtidos por vários autores que estudaram o desenvolvimento do reparo alveolar, sendo que no último período aos 21 dias, foi verificado um tecido ósseo maduro caracterizado por trabéculas ósseas espessas e definidas e redução das áreas ocupadas por tecido conjuntivo, além da presença de

tecido medular permeando o tecido ósseo neoformado (OKAMOTO; RUSSO, 1973).

Considerações finais

De acordo com a metodologia empregada e com resultados obtidos da avaliação histológica, fica claro que a reparação óssea alveolar em camundongos é um excelente meio de estudo para avaliar a cinética do reparo e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos. Nesse contexto vale ressaltar que o processo angiogênico é um fundamental autor para o desfecho da restauração do osso, pois o mesmo abriga fatores que desencadeiam a resposta imune inflamatória para modulação do reparo ósseo alveolar.

Referências bibliográficas

AMLER, MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969;27(3):309-18.

BABIC, A.M.; CHEN, C.C.; LAU, L.F. Fisp 12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cells adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, v. 19, p. 2958-2966, 1999.

BABIC, A.M.; KIREEVA, M.L.; KOLESNIKIVA, T.V.; LAU, L.F. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 6355-6360, 1998.

BIRN H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis ("dry socket"). *Int J Oral Surg.* 1973;2:211-63.

BROUGHTON G, 2ND, JANIS JE, ATTINGER CE. *Wound healing: an overview. Plast Reconstr Surg.* 117(7 Suppl):1e-S-32e-S. 2006.

BROWN, L. F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.; NAGY, J. A.; FENG, D.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 79:233-69, 1997.

BURNOUF, T et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factoris in regenerative medicine. *Blood Rev* 27:77-89.

CARDOSO, L. C. Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. 2009.

CARREL, A. 1910. *The treatment of wounds.* *JAMA.* 55:2148.

CARVALHO, ACP; OKAMOTO, T. Reparação do alvéolo dental In: Carvalho ACP, Okamoto T. *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica.* São Paulo: Panamericana; 1987. p. 55-80.

CHOI, B.M.; KWAK, H.J.; JUN, C.D.; PARK, S.D.; KIM, K.Y.; KIM, H.R.; CHUNG, H.T. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming

growth factor- beta 1 oligodeoxynucleotides. *Immunol. Cell. Biol.*, v. 74, p. 144-150, 1996.

CLARK RAF. Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: *Pathologic Basis of Disease*, 7th ed., Ed. Saunders. p.112. 2005.

CLARK, R.A.; Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am. J. Med. Sci.*, v. 306, p. 42-48, 1993.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCROEN, F. J. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

CULLINAN-BOVE, K.; KOOS, R.D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogeninduced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*. 133(2):829-37, 1993.

ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. *British Medical Bulletin*, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.

EMERY, P. W.; SANDERSON. P. Effect of dietary restriction on protein synthesis and wound healing after surgery in the rat. *Clin Sci (Lond)*, v. 89, n. 4, p.383-388, Oct. 1995.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOOBELER, M.; DEBUS, S.; BRÜCKER, E. B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase- specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. *Am. J.Pathol.*, v.153, p. 1849-1860, 1998.

EULER, H. Heilung von extractions wunden: line tue experimentalle studie. *Dtsch Mschr Zahnheilk*. 1923;41:687-700.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*. 55:15-35, 2000.

GALE, N.W. ; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. *Genes Dev.*, v.13, p. 1055-1066, 1999.

HANAHAN, D. (1997), Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 277, 48- 50.

Hellen, C. U., Sarnow, P. (2001). Internal Ribosome Entry Sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & Development* 15, 1593-1612.

HELDIN, C.H.; WESTRMARK, B.; Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.*, v. 79, p. 1283-1316, 1999.

HUEBSCH, RF *et al.* The healing process following molar extraction: I. normal male rats. *J oral Surg.* 1952;5(8):864-76.

HUTSON, J.M.; NIAL, M. EVANS, D.; FOWLER R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature*, v. 279, p. 793-795, 1979.

JACOBSSON SA, DJERF K, IVARSSON I, WAHLSTROM O. Effect of diclofenac on fixation of hydroxyapatite-coated implants. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br.* 1994;76(5):831-3.

JOHANSEN, J.R. Repair of the post-extraction alveolus in the wistar rat: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand.* 28(4):441-61;1970.

JOHNSON, L. R. Fundamentos de fisiologia médica. 2ª Ed., Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 502- 511, 2000.

JOHNSON, L. R. Fundamentos de fisiologia médica. 2ª Ed., Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 502- 511, 2000.

KALYVAS DG, TARENIDOU M. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration. *J Oral Sci.* 2008;50(3):239-46.

KUMAR, VINAY; ABBAS, ABUL K.; ASTER, JON C.: Robbins Patologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E.F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.*, v. 332, p. 1553-1559, 1995.

LIN, W.L.; MCCULLOCH, C.A.; CHO, M.L. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 240(4):492-506, 1994.

Manash KP, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase: Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci.* 2004; 1:101-15.

MICHAEL G. NEWMAN / HENRY TAKEI / PERRY R. KLOKKEVOLD / FERMIN A. CARRANZA JR., *Carranza Periodontia Clínica – 11ª Edição – 2012.*

OKAMOTO, T.; RUSSO, M. C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odont Araçatuba*, v. 2, n. 2, 1973.

RISAU, W. Angiogenic growth factors. *Prog. Growth Factor Res.*, v. 2, p. 71-79, 1990.

SIMPSON, HE. The healing of extraction wounds. *Braz Dent J.* 126(12):550-7. 1969.

STOUFFER, R. L., MARTINEZ-CHEQUER, J. C., MOLSKNESS, T. A. XU, F., HAZZARD, M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of Medical Research* 32, 567-575. (2001).

TAKAYANAGI H. [Signaling mechanism in the regulation of osteoclast differentiation by the immune system]. *Seikagaku.* 2003;75(12):1535-40.

TAZIMA MFGS, VICENTE YAMVA, MORIYA T. 2008. *Biologia da ferida e cicatrização.* Medicina (Ribeirão Preto). 41(3): 259-64.

TROMBELLI, L.; FARINA, R.; MARZOLA, A.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 630-9.

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999;43(6):415-22.

WAGNER, C. L.; MASCELLI, M. A.; NEBLOCK, D. S.; WEISMAN, H. F.; COLLIER, B.S.; JORDAN, R.E. Analysis of GP IIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, v. 88, p. 907-914, 1996.